

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-269061

(43)Date of publication of application : 15.10.1996

(51)Int.Cl.

C07D491/044
A61K 31/40
A61K 31/40
C12P 17/18
//(C12P 17/18
C12R 1:80)

(21)Application number : 07-069255

(71)Applicant : RIKAGAKU KENKYUSHO

(22)Date of filing : 28.03.1995

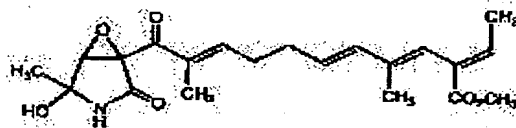
(72)Inventor : OSADA HIROYUKI
KAKEYA HIDEAKI
ISONO KIYOSHI
TAKAHASHI ISAMU

(54) ANTITUMOR SUBSTANCE EPOLACTAENE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new antitumor substance epolactaene produced by a new mold belonging to the genus *Penicillium* and useful as an antitumor agent and a nerve differentiation inducing agent.

CONSTITUTION: This epolactane is expressed by the formula. The compound is produced preferably by using an epolactane-producing strain belonging to the genus *Penicillium* such as *Penicillium* sp. BM1689-P and culturing the strain on a Czapek agar medium, Czapek yeast extract agar medium or malt extract agar medium at 10-38° C (especially 32° C). The compound can be administered by oral administration as well as parenteral administration. In the case of nasal administration, the daily dose of the active component for adult is 1-100mg/kg (preferably 2-10mg/kg) in one dose or several divided doses.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.05.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 8 - 2 6 9 0 6 1

(43) 公開日 平成 8 年 (1 9 9 6) 1 0 月 1 5 日

(51) Int. Cl. °	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C07D491/044		9271-4C	C07D491/044	
A61K 31/40	AAA		A61K 31/40	AAA
	ADU			ADU
C12P 17/18			C12P 17/18	C
//(C12P 17/18				

審査請求 未請求 請求項の数 1 0 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

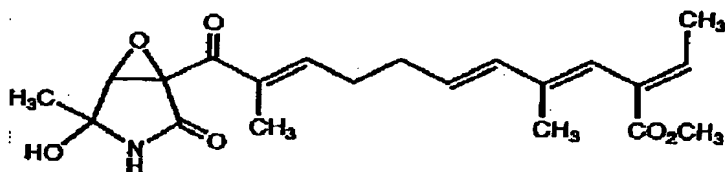
(21) 出願番号	特願平 7 - 6 9 2 5 5	(71) 出願人	0 0 0 0 0 6 7 9 2 理化学研究所 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
(22) 出願日	平成 7 年 (1 9 9 5) 3 月 2 8 日	(72) 発明者	長田 裕之 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所 内
		(72) 発明者	掛谷 秀昭 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所 内
		(72) 発明者	磯野 清 静岡県清水市折戸 3 2 4 - 1
		(72) 発明者	高橋 勇 静岡県藤枝市南駿河台 1 丁目 8 - 1 2
		(74) 代理人	弁理士 塩澤 寿夫 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 抗腫瘍性物質エボラクタエン

(57) 【要約】

【構成】 下記の式：

【化 1】



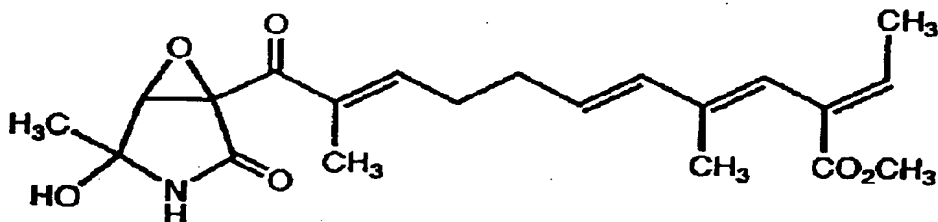
で示されるエボラクタエン；及びベニシリウム属に属するエボラクタエン産生菌を培養し培養物からエボラクタエンを採取することを特徴とするエボラクタエンの製造方法。

【効果】 神経細胞に対する分化誘導作用を有しており、例えば神経腫瘍などの治療、並びに、例えば神経疾患等の治療及び／又は予防に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の式：

【化 1】



で示されるエボラクタエン。

【請求項 2】 ペニシリウム属に属し請求項 1 に記載のエボラクタエンを産生するカビ。

【請求項 3】 ペニシリウム・エスピー・BM1689-P 株である請求項 2 記載のエボラクタエン産生菌。

【請求項 4】 ペニシリウム・エスピー・BM1689-P 株。

【請求項 5】 ペニシリウム属に属する請求項 1 に記載のエボラクタエン産生菌を培養し、培養物から該エボラクタエンを採取することを特徴とする、請求項 1 に記載のエボラクタエンの製造方法。

【請求項 6】 ペニシリウム・エスピー・BM1689-P 株を培養する請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】 請求項 1 に記載のエボラクタエンを有効成分とする神経分化誘導剤。

【請求項 8】 請求項 1 に記載のエボラクタエンを有効成分とする神経疾患の治療・予防剤。

【請求項 9】 請求項 1 に記載のエボラクタエンを有効成分とする抗腫瘍剤。

【請求項 10】 神経腫瘍の治療及び／又は予防に用いる請求項 9 に記載の抗腫瘍剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規化合物であるエボラクタエン及びその製造方法、並びにその用途に関する。さらに詳しくは、本発明は新規なエボラクタエン、ペニシリウム属に属し該エボラクタエンを産生するカビ、該カビを用いて該エボラクタエンを製造する方法、並びに該エボラクタエンを有効成分とする神経分化誘導剤及び抗腫瘍剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 抗腫瘍剤としては、従来、アドリアマイシン、マイトマイシン C、またはブレオマイシン等が知られている。これらは、インターカレーション、架橋形成、または DNA 鎖切断等の作用機構によって DNA の構造や機能に対して直接的な作用を及ぼして核酸合成系を阻害するものであり、増殖速度の速い腫瘍細胞に対して細胞毒性を発揮する。しかしながら、これらの薬剤は腫瘍細胞に対しての特異性が十分ではなく、増殖のさかんな骨髄細胞などの正常細胞に対しても毒性を示すので、治

療に際して重篤な副作用を伴うという問題があった。

【0003】 一方、腫瘍細胞に対して特異的に分化誘導作用を有する化合物は抗腫瘍剤として有用であることが期待されており、従来、血球系の腫瘍に対する分化誘導療法の検討が数多くなされている。神経系の腫瘍に対しては、ジブチリルサイクリック AMP が神経細胞に対して神経分化特有の樹状突起の形成を促進する作用を有することが知られている。しかしながら、神経系の腫瘍に対する分化誘導療法の検討は上記のもの以外はほとんどなされていないのが現状である。また、近年、老人人口の増加に伴って老人性痴呆症などの脳疾患における有効な治療法の確立が求められているが、これらの疾患に対して有効な薬剤は知られていない。

【0004】

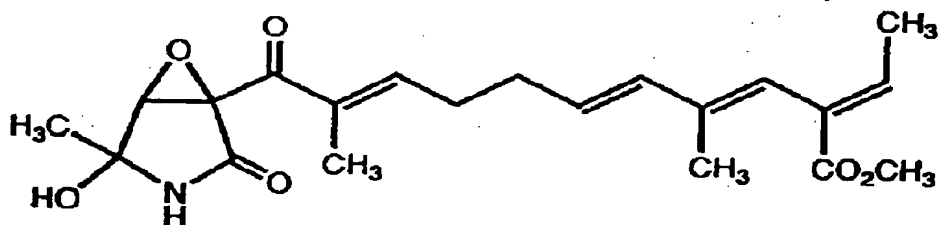
【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、腫瘍細胞に対して高い特異性を示す新規な抗腫瘍剤を提供することにあり、別の観点からは、特に神経系の腫瘍等に対して分化誘導作用に基づく抗腫瘍作用を発揮する新規な抗腫瘍剤を提供することにある。また、本発明の別の目的は、脳神経などの神経細胞に対して分化誘導作用を有し、老人性痴呆等の脳疾患に対して有効な神経分化誘導剤を提供することにある。さらに本発明は、上記の抗腫瘍剤及び神経分化誘導剤の有効成分である化合物の製造方法を提供することを目的としている。より具体的には、上記の化合物を産生する新規なカビ、および該カビを用いて該化合物を製造する方法を提供することも本発明の目的の一つである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、ペニシリウム属に属する新規なカビが産生する新規化合物が細胞分化誘導作用を有しており、特に神経細胞に対して優れた分化誘導作用を有することを見いだした。また、本発明は、上記の化合物が抗腫瘍剤及び神経分化誘導剤として極めて有用であることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

【0006】 すなわち本発明は、下記の式：

【化 2】



で示されるエポラクタエンを提供するものである。本発明の別の態様によれば、上記エポラクタエンを有効成分とする神経分化誘導剤；神経疾患の治療・予防剤；及び抗腫瘍剤、並びに神経腫瘍の治療及び／又は予防に用いる上記抗腫瘍剤が提供される。

【 0 0 0 7 】本発明のさらに別の態様によれば、ペニシリウム属に属し上記のエポラクタエンを産生するカビが提供される。その好ましい態様として、ペニシリウム・エスピー・BM1689-P株が提供される。さらに、上記産生菌を培養し培養物からエポラクタエンを採取することを特徴とする、上記エポラクタエンの製造方法も提供される。ペニシリウム・エスピー・BM1689-P株を産生菌として用いる方法は上記発明の好ましい態様である。

【 0 0 0 8 】本発明のエポラクタエンは 3 個の不斉炭素を有しており、これら 3 個の不斉中心に基づく光学異性体またはジアステレオ異性体が存在するが、本発明のエポラクタエンには上記立体異性体の全てが包含される。また、光学的あるいはジアステレオ的に純粋な上記立体異性体のほか、光学異性体の任意の割合の混合物やラセミ体、あるいはジアステレオ異性体の任意の割合の混合物なども全て本発明の範囲に包含される。

【 0 0 0 9 】本発明のエポラクタエンは、内浦湾の海底 102 m から採取された土壌から分離されたカビBM1689-P

株を培養した培養物から分離採取された。下記の生物学的性質に基づき、本発明の放線菌BM1689-P株はペニシリウム(Penicillium)属に属するカビであることが判明した。なお、ペニシリウム・エスピー・BM1689-P株は、平成 7 年 3 月 24 日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-14856 として寄託されている。

【 0 0 1 0 】本発明のエポラクタエンを生産するカビ B M1689-P 株は、以下の生物学的性質を有する。

(1) 形態学的特徴

(i) 分生子柄

110 ~ 200 × 1.8 ~ 3.5 μm で滑面、微細な突起を有する。また、複輪生のペニシリを形成する。

(ii) メトレ

10.0 ~ 13.0 × 2.3 ~ 3.0 μm で 4 ~ 8 本が束生する。

(iii) フィアライド

11.0 ~ 15.0 × 1.8 ~ 2.5 μm で輪生体となる。

(iv) 分生子

3.5 ~ 4.2 × 2.6 ~ 3.5 μm で滑面、亜球形から楕円型である。

(2) 培養性状

【 0 0 1 1 】各種寒天培地を用い、25℃で 7 日間培養した場合の生育的特徴を示す。

【表 1】

培 地	集落の直径(mm)	集落の色	集落裏面の色	集落の状態
ツアベック寒天培地	18 ~ 21	緑褐色	白色	ビロード状
ツアベック酵母エキス 寒天培地	20 ~ 22	暗緑色	茶色	ビロード状
麦芽エキス寒天培地	27 ~ 39	暗緑色	淡黄色	ビロード状

【 0 0 1 2 】いずれの培地でも分生子形成は良好で、分泌液は認められない。また、37℃での培養時、未熟な菌核状組織が形成される場合がある。なお、本菌株の生育温度範囲は 10 ~ 38℃、生育至適温度は 32℃である。以上の菌学的諸性質より、BM1689-P株をペニシリウム・エスピー(Penicilliumsp.) と同定した。

【 0 0 1 3 】本発明のエポラクタエンを製造するには、上記のペニシリウム・エスピー・BM1689-P株の他、ペニシリウム属に属するエポラクタエン産生菌を用いることができる。このような菌のうち、BM1689-P株は好ましい菌株である。このようなペニシリウム属に属するエポラクタエン産生菌を培養して培養物から本発明のを分離採取するには、当業者に周知の方法によればよい。その一

例として以下に実施例を示すが、本発明のエポラクタエンの製造方法はこれらの例に限定されることはなく、当業者により種々の改変や修飾が可能であることはいうまでもない。

【 0 0 1 4 】本発明のエポラクタエンは抗腫瘍作用を有しているので、本発明のエポラクタエンを有効成分として含む医薬は、ヒトを含む哺乳類の各種の腫瘍の治療に有用である。特に、本発明の抗腫瘍剤は脳神経などの神経系の腫瘍の治療に有用である。また、本発明のエポラクタエンは、脳神経などの神経系細胞に対して分化誘導作用を有するので、神経分化誘導剤として有用である。なお、本明細書で神経という場合には、脳神経などの中枢神経の他、末梢神経などの神経系の全てが含まれる。

【0015】本発明の医薬としては、有効成分である上記のエポラクタエンをそのまま患者に投与してもよいが、上記の化合物の1種あるいはそれ以上を有効成分として含む医薬組成物を製剤添加物を用いて製造し、医薬組成物の形態で患者に投与することが好適である。本発明の医薬の有効成分としては、上記の一般式に包含される遊離形態の化合物の他、任意の水和物を用いてもよい。本発明の医薬の投与形態は特に制限されず、経口的又は非経口的に投与することができる。上記の医薬組成物の製造に用いる薬理学的、製剤学的に許容しうる添加物としては、例えば、賦形剤、崩壊剤ないし崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤ないし溶解補助剤、等張化剤、pH調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等を挙げることができる。

【0016】経口投与に適する製剤の例としては、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、液剤、又はシロップ剤等を挙げることができる。また、非経口投与に適する製剤としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、吸入剤、又は貼付剤等を挙げることができる。経口投与に適する製剤には、薬理学的、製剤学的に許容しうる添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

【0017】経皮又は経粘膜投与に適する製剤は、例えば、フロン、ジエチルエーテル、又は圧縮ガス等の噴射剤；ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルアルコール、メチルセルロース、ポリイソブチレン、ポリブテン等の粘着剤；木綿布又はプラスチックシート等の基布等の製剤用添加物を用いて製造することができる。注射あるいは点滴用に適する製剤には、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成しうる溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等のpH調節剤等の製剤用添加物を添加して製造してもよい。

【0018】本発明の抗腫瘍剤は、胃癌、肺癌、肝臓癌、腎臓癌、脳腫瘍、大腸癌、食道癌などの固形癌、あるいは悪性リンパ腫、白血病などのあらゆる種類の癌の治療に用いることができるが、特に、神経腫瘍、例えば脳腫瘍の治療に用いることが好ましい。また、本発明

の神経分化誘導剤は、老人痴呆症などの脳疾患の治療及び／又は予防に有用である。もっとも、本発明の医薬の適用対象は上記のものに限定されることはなく、また、一般的に悪性腫瘍や神経疾患の治療に用いられる他の薬剤と併用してもさしつかえない。本発明の抗腫瘍剤及び神経分化誘導剤の投与量は特に制限されず、投与形態、年齢、体重、症状等に応じて適宜選択すればよい。例えば、経鼻投与の場合には、成人1日あたり有効成分量として1~100 mg/Kg、好ましくは2~10 mg/Kgを投与すればよい。投与は1日あたり1回もしくは数回に分けてもよく、投与期間も、年齢、症状等に応じて任意に定めることができる。

【0019】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

(A) 製造例

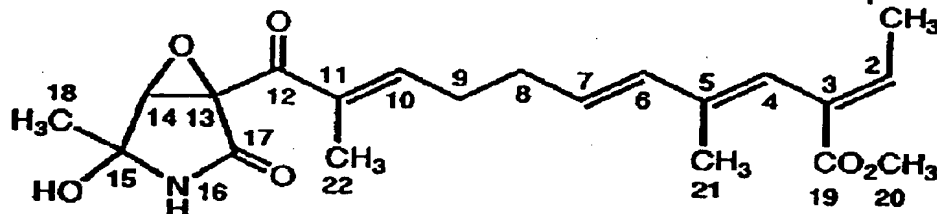
グルコース(3.5%)、可溶性澱粉(1%)、肉エキス(0.5%)、ポリペプトン(0.5%)、酵母抽出液(0.3%)、食塩(0.2%)、リン酸第二カリウム(0.05%)、硫酸マグネシウム(0.05%)、及び大豆粉(2%)の組成の培地(pH 5.8)にベニシリウム・エスピー・BM1689-P株を接種し、28℃で48時間振盪培養を行った。この培養液140 mlを同組成の培地18 リットルに接種し、28℃で50時間にわたって毎分7 リットルの通気を行いながら、毎分 300回転の振盪培養を行った。

【0020】上記培養液を遠心分離機(6,000 回転/分)で菌体と上清に分離し、菌体を80% アセトン5 リットルを用いて抽出した。減圧濃縮後、得られた水溶液をpH 7.0に調整し、5 リットルの酢酸エチルで2 回抽出を繰り返した。抽出後、全ての酢酸エチルを合わせて減圧濃縮し、褐色のシロップ 4.7 gを得た。このシロップをクロロホルム 10 mlに溶解し、クロロホルムで調製したシリカゲルカラム(直径 4 cm, 長さ 60 cm)に浸潤させた。最初にクロロホルム 1リットルで溶出した後、配合割合を順次変えたクロロホルム-メタノール溶液(10:0:1, 100:2, 100:5, 100:10, 100:20, 100:50)各 500 ml ずつで溶出し、最後にメタノール 1リットルで溶出した。活性成分はクロロホルム-メタノール溶液(100:5 から100:10)の画分に溶出した。この分画を減圧濃縮することにより、1.6 g の褐色シロップを得た。

【0021】さらにこの褐色シロップ 0.8 gをクロロホルム-メタノール溶液(1:1)に溶解し、同じ溶液で調製したセファデックス LH-20(ファルマシア社製)カラム(直径 2 cm, 長さ 65 cm)に吸着させ、クロロホルム-メタノール溶液(1:1)で溶出した。各10 ml ずつ分取し、主な活性画分であるフラクションを集めて減圧濃縮し、260 mgの褐色のシロップを得た。次に ODSカラム(直径 2 cm, 長さ 25 cm; カプセルパック, 資生堂社製)を用いて高速液体クロマトグラフィーによる分取

(80% メタノール、流速 8 ml/分) を行い、無色アモルファス状物質 15 mg を得た。最後に ODS カラム (直径 2 cm, 長さ 25 cm; カプセルパック, 資生堂社製) を用いて高速液体クロマトグラフィーによる分取 (60% メタノール、流速 8 ml/分) を行い、無色アモルファス状物質 5 mg を得た。

- 【0022】1. 物質の性状: 無色アモルファス状
 2. 比旋光度: $[\alpha]_D^{25}$, +32° (26°C, c=0.1, MeOH)
 3. 分子量、分子式: 高分解能 EI マススペクトル分析により MW=389, C₂₁H₂₇N₂O₄
 4. 溶解性: メタノール、エタノール、ジメチルスルホキ



【0024】

【表 2】

位置	¹³ C	¹ H	J (Hz)
1	16.0	1.72 (dd)	1.2 7.3
2	140.9	6.93 (dq)	1.0, 7.3
3	131.9		
4	123.7	5.94 (br. s)	
5	139.6		
6	136.6	6.27 (d)	15.6
7	129.7	5.77 (dt)	15.6, 7.8
8	32.6	2.35 (m)	
9	30.1	2.47 (m)	
10	150.0	7.01 (dt)	1.0, 7.3
11	137.2		
12	192.1		
13	63.9		
14	66.1	3.98 (s)	
15	84.8		
17	172.2		
18	22.2	1.51 (s)	
19	169.6		
20	52.4	3.71 (s)	
21	14.6	1.61 (d)	1.3
22	11.1	1.82 (s)	

【0025】(B) 試験例

マウス神経芽腫細胞 Neuro 2A 細胞は、公知の神経分化

シドに易溶。ヘキサン、水に不溶

5. 呈色反応: 硫酸、ニンヒドリン、ヨウ素に陽性

6. 紫外線吸収スペクトル: λ_{max} (MeOH) (ϵ): 232 nm (21800), 280 nm (sh, 15600)

7. 赤外線吸収スペクトル: ν (KBr): 3420, 2920, 1720, 1640, 1435, 1270, 1135, 970, 965

8. 核磁気共鳴スペクトル (¹H-NMR 及び ¹³C-NMR): CD₃OD 中, ¹H-NMR: 600 MHz, ¹³C-NMR: 100 MHz, δ ppm, 内部標準 TMS

10 【0023】

【化 3】

誘導剤であるジブチリルサイクリック AMP により分化が誘導され、神経突起を伸長する (J. Antibiotics, 44, 113, 1991)。一方、ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞においても、ジブチリルサイクリック AMP を添加すると神経分化特有の樹状突起を形成した。そこで、本発明のエボラクタエンについて、ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞に対する樹状突起形成促進作用を上記の方法により検討した。結果を表 3 に示す。表中、樹状突起形成率は、全細胞数に対する樹状突起形成細胞数の割合を示す。

【0026】

【表 3】

エボラクタエン (μ g/ml)	樹状突起形成率 (%)
0	4
1.25	8
2.5	24
5	61
10	74

40 【発明の効果】本発明のエボラクタエンは、例えば神経腫瘍などの治療に用いる抗腫瘍剤、並びに、例えば神経疾患等の治療及び/又は予防に用いる神経分化誘導剤として有用である。本発明により提供される新規微生物ならびに製造方法は、上記のエボラクタエンを効率的に製造するために有用である。

(6)

特開平 8 - 2 6 9 0 6 1

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁸

C12R 1:80)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所